



## Enhanced Sensitive ISH Detection Kit IV(CY3)

### 敏感性加强型原位杂交检测试剂盒 IV (CY3)

**产品货号:** MK1033

**保存:** 置4°C。

**工作量:** 100张切片。

**有效期:** 一年。

所谓原位杂交是指借助于核酸分子杂交的方法,在显微镜水平检测和定位特异的核苷酸片段。现在原位杂交已成为在分子水平研究肿瘤和遗传性疾病的发生,发展和调控等根本性问题的有力工具,其作用是免疫组化所无法代替的。博士德专门设计了敏感性加强型原位杂交检测试剂盒。具有敏感性特高,操作简便和结果准确的优点。该试剂盒用于 mRNA 的杂交,不推荐使用每个探针分子仅标记一个地高辛的寡核苷酸探针。如果使用 cDNA 探针,应在杂交之前变性探针。

#### 试剂盒中内容:

- |                       |                |
|-----------------------|----------------|
| 1. 胃蛋白酶 (×10; Pepsin) | 2ml;           |
| 2. 预杂交液               | 2ml;           |
| 3. 寡核苷酸探针杂交稀释液        | 2ml;           |
| 4. 封闭液                | 5ml;           |
| 5. 生物素化鼠抗地高辛          | 5ml;           |
| 6. SABC--CY3          | 100μl (1:100)。 |

#### 用户自备试剂:

原位杂交专用盖玻片; POLY-L-LYSINE; DEPC; 20%甘油;

缓冲液 (3%柠檬酸, 2×SSC(AR0058), 0.5×SSC, 0.2×SSC, 0.5M PBS(AR0033))

#### 一. 培养细胞和冰冻切片

##### 准备工作:

3%柠檬酸——100ml 蒸馏水中加柠檬酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O) 3g, pH2.0 左右。

2×SSC——1000ml 蒸馏水中加氯化钠 17.6g, 柠檬酸三钠 (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O, 分子量 294) 8.8g。

0.5×SSC——300ml 蒸馏水加 100ml 2×SSC 即可。

0.2×SSC——270ml 蒸馏水加 30ml 2×SSC 即可。

20%甘油——20ml 甘油加 80ml 蒸馏水即可。

0.5M PBS——1000ml 蒸馏水加氯化钠 30g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 6g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.4g, PH7.2-7.6。

##### 操作程序:

注意: 最重要的是及时固定, 并在固定液中加入 0.1%的 DEPC 处理, 以抑制 RNA 酶对 mRNA 的分解作用。

1. 玻片的处理: 一般采用多聚赖氨酸或 APES。切片厚度 10-20μm。

2. 细胞在多聚赖氨酸处理的盖玻片上进行培养, 条件为 37°C和 5%的 CO<sub>2</sub>, 所用培养基为 Dulbecco 基础培养基。细胞长好后 0.5M PBS(PH7.4)洗 2min×3 次。

3. 培养细胞和冰冻切片均可用下述方法固定: 固定液为 4%多聚甲醛, 含有 1/1000 DEPC。室温固定 20-30min。蒸馏水充分洗涤, 干燥后-20°C冰冻可保存 2 周以上。

4. 暴露 mRNA 片段: 切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶 (1ml 3%柠檬酸加 2 滴浓缩



型胃蛋白酶，混匀），37°C或室温消化 5-120 秒钟。有时也可以不消化。0.5M PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。

5. 预杂交：湿盒的准备——干的杂交盒底部加 20%甘油 20ml 以保持湿度。按每张切片 20μl 加预杂交液。恒温箱 37-40°C 2-4 小时。吸取多余液体，不洗。

6. 杂交——用杂交稀释液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针，浓度一般 0.5-2μg/ml。按每张切片加 20μl 杂交液。将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭掉后，盖在切片上。恒温箱 37-40°C 杂交过夜。

7. 杂交后洗涤：揭掉盖玻片，30-37°C 左右水温的 2×SSC 洗涤 5min×2 次；0.5×SSC 洗涤 15min×1 次；0.2×SSC 洗涤 15min×1 次。必要时可重复 0.2×SSC 洗涤 1 次。

8. 滴加封闭液：37°C 30min。甩去多余液体，不洗。

9. 滴加生物素化鼠抗地高辛：37°C 60min 或室温 120min。0.5M PBS 洗 5min×4 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。

10. 滴加 SABC-CY3：取 1μl SABC-CY3 加原位杂交用 PBS 100μl，每张切片加 50μl 37°C 30min。0.5M PBS 洗 5min×3 次。勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤。

11. 用水溶性封片剂或抗荧光衰减封片剂封片后，荧光显微镜观察。

## 二. 石蜡切片

如果有条件的话，应尽可能地采用新鲜标本。标本离体后，及时予以固定。固定液为 4% 多聚甲醛，含有 1/1000 DEPC。标本较大时用刀片切成厚度不超过 4mm 的小块，固定 1 小时即可，较大的标本固定不要超过 2 小时。某些组织对过度固定尤其敏感，如动物大脑，固定时间 30-40min，一般不要超过 1 小时。

1. 常规脱水、浸蜡、包埋。切片厚度 6-8μm。

2. 玻片的处理：一般采用多聚赖氨酸或 APES。

3. 石蜡切片经常规脱蜡至水。

4. 暴露 mRNA 片段：切片上滴加 3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶（1ml 3%柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶，混匀），37°C或室温消化 3-30min（视标本新旧、厚薄自行调整）。充分的消化可以使 mRNA 得到暴露，从而增强杂交信号；但另一方面，过度的消化又使切片明显减薄乃至消失，从而失去杂交信号。由于用户的切片情况各不相同，这就需要用户比较不同的消化时间，例如 5min，10min，20min，30min。以找到最佳的消化时间。0.5M PBS 洗 3 次×5min。蒸馏水洗 1 次。

其余步骤和冰冻切片 5-11 步相同。

结果观察：阳性细胞的胞浆着色呈红色。

注意事项：如果有少量的细胞核着色属于正常情况；如果出现大量的细胞核着色，往往和标本固定时间过长有关，应重新处理标本。有其它明显的非特异性染色现象时，可以用预杂交液对含探针的杂交液进行稀释，一般稀释 2-5 倍。